



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 53 854 A 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
C 12 P 19/34
C 07 H 1/00

⑳ Aktenzeichen: 199 53 854.9
㉔ Anmeldetag: 9. 11. 1999
㉕ Offenlegungstag: 28. 6. 2001

DE 199 53 854 A 1

㉗ Anmelder:
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften e.V., 14195 Berlin, DE; DIREVO
BioTech AG, 37083 Göttingen, DE

㉘ Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

㉚ Erfinder:
Koltermann, Andre, Dr., 37075 Göttingen, DE;
Kettling, Ulrich, Dr., 37077 Göttingen, DE; Eigen,
Manfred, Prof. Dr., 37077 Göttingen, DE

㉞ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

WO 99 29 902 A1
WO 98 58 080 A1
WO 97 20 078 A1

BIOSIS Abstract, Ref. 1997:250012;
Chemical Abstract, Vol.130, Ref. 307153;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉙ Verfahren zur Herstellung von Biopolymeren mit veränderten Eigenschaften

㉚ Es wird ein Verfahren beschrieben zur Erzeugung von
Biopolymeren mit veränderten Eigenschaften, sowie ein
Kit, enthaltend Instruktionen zur Durchführung eines sol-
chen Verfahrens.

DE 199 53 854 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erzeugung von Polynucleotidmolekülen mit veränderten Eigenschaften, sowie ein Kit enthaltend Instruktionen zur Durchführung eines solchen Verfahrens.

Biomoleküle – und insbesondere Biopolymere wie Polynucleotide, Polypeptide, Polysaccharide etc. – sind nicht nur Grundlage des uns bekannten biologischen Lebens, sondern finden zunehmend auch in den verschiedensten technischen Anwendungsfeldern Verwendung. Die Suche nach neuen funktionalen Biomolekülen, ihre Isolierung bzw. Herstellung, sowie ihre technische Anwendung ist Gegenstand der modernen Biotechnologie. Neben das zufällige Auffinden von bislang unbekannten Biomolekülen mit gewünschten Eigenschaften in der Natur (vgl. Naturstoff-Screening) treten seit einiger Zeit Verfahren, die die Prinzipien der natürlichen Evolution im Labor nachvollziehen und so gänzlich neuartige Biomoleküle mit bestimmten Eigenschaften generieren (WO 92/18645; Eigen und Rigler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 5740; Koltermann und Kettling, Biophys. Chem. 66 (1997), 159; Kettling et al., Current Topics in Microbiol. & Immunol. 243 (1999), 173). Diese als evolutive Biotechnologie, im englisch-amerikanischen Sprachraum auch als applied molecular evolution oder directed molecular evolution bezeichnete Technik greift die Erkenntnisse auf, die langjährige theoretische und experimentelle Evolutionsforschung erbracht haben, und setzt sie zur gerichteten Evolution von Biomolekülen ein.

Stark vereinfacht ausgedrückt erfolgt eine evolutive Generierung molekularer Funktionen durch ein wechselseitiges Wirken von Variations- und Selektionsvorgängen auf Molekülpopulationen. Während die Variation am Informationsgehalt eines Biomoleküls ansetzt, erfolgt die Selektion anhand des molekularen Phänotyps. Information eines Polynucleotidmoleküls (Genotyp) bezeichnet dabei die sequentielle Abfolge von verschiedenen Monomeren in einem Polynucleotidmolekül. Der Phänotyp eines Polynucleotidmoleküls bezeichnet die Summe der Funktionen und Eigenschaften eines Polynucleotidmoleküls sowie der durch ein Polynucleotid codierten Transkriptions- oder Translationsprodukte. Die Kopplung zwischen Sequenzinformation und selektierbarem Phänotyp kann dabei entweder durch amplifikationsgekoppelte Selektion (Kettling, Dissertation, Göttingen/TU Braunschweig (1999)), durch Kompartimentierung und Funktionsanalyse, Screening genannt, (WO 92/18645; WO 99/34195) oder durch physikalische Kopplung zwischen Genotyp und Phänotyp sowie deren Selektion erreicht werden (DE 196 46 372; US 5,849,545; DE-A 143 05 651).

Entscheidend für den Erfolg evolutiv-biotechnologischer Strategien ist die Art des Zusammenwirkens von Variations- und Selektionsprozessen. In der Natur wie im Labor hat sich – gemessen an der für eine evolutive Generierung und Optimierung molekularer Funktionen benötigten Zeit – das Quasi-Spezies-Prinzip als erfolgreichste Strategie erwiesen. Als Quasi-Spezies wird dabei eine durch fehlerhafte Replikation entstehende, dynamische Population miteinander verwandter Molekülvarianten (Mutanten) bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, daß entsprechend des Quasi-Spezies-Prinzips nicht der Wildtyp (Schwerpunkt der Quasi-Spezies), sondern die gesamte Verteilung Objekt der Selektion ist. Unter veränderten Selektionsbedingungen sind vorteilhafte Varianten in einer solchen Mutantenverteilung bereits entsprechend ihrem Fitnesswert enthalten und müssen nicht erst durch anschließende, zufällige Mutationen entstehen. Bei Verschiebung der Selektionsparameter gleicht die evolutive Generierung dann einer implizit gelenkten Drift der Quasi-Spezies entlang von Graten der Wertelandschaft. Die Herstellung von Quasi-Spezies und die Anwendung dieses Prinzips für die evolutive Biotechnologie ist beschrieben in WO 92/18645.

Grundlage für die Erzeugung einer Quasi-Spezies ist eine fehlerhafte Replikation der Molekülvarianten. Bei Verwendung von Polynucleotiden erfolgt die Replikation bevorzugt mit Hilfe von Replikationsenzymen, d. h. Polymerasen, die die matrizengesteuerte Synthese eines Polynucleotidmoleküls ermöglichen. Die Einführung von Fehlern, d. h. die Variation der Molekülinformation, kann durch den inhärent fehlerhaften Kopierprozess allein, aber auch durch eine gezielte Erhöhung der Ungenauigkeit der Polymerase (z. B. definiert ungleichgewichtige Zugabe der Monomere, Zugabe von Basenanaloga, fehlerhafte PCR, Polymerasen mit sehr hoher Fehlerrate), durch chemische Modifikation von Polynucleotiden nach erfolgter Synthese, durch die komplette Synthese von Polynucleotiden unter zumindest teilweisem Einsatz von Monomergemischen und/oder von Nucleotidanaloga, sowie durch eine Kombination dieser Verfahren erreicht werden.

Neben diesen Verfahren zum Erzeugen punktueller Mutationen (in Form von Basenaustausch, -deletion und -insertion) stellt die Rekombination von Sequenzabschnitten in der Natur eine sehr erfolgreiche Strategie zur Kombination von punktuellen Mutationen, aber auch von Domänen innerhalb eines Polymers, von Untereinheiten eines Heteromultimers, oder von Genvarianten innerhalb eines Genclusters oder eines Genoms dar. Insbesondere der homologen Rekombination, d. h. der Kombination sich entsprechender Sequenzabschnitte aus verschiedenen Varianten unter Beibehaltung von Orientierung und Leseraster kommt eine große Bedeutung zu, da der mit einer unspezifischen Rekombination verbundene Rauschhintergrund von Sequenzen ohne Zusammenhang mit dem zu selektierenden Phänotyp unterbunden werden kann. Im Sinne des Quasi-Spezies-Prinzips stellt die homologe Rekombination eine gezielte Ausweitung der Sequenzverteilung dar. Verschiedene verwandte Unterverteilungen einer Quasi-Spezies, die aufgrund der wichtenden Wertelandschaft entstehen, aber im relativen Verwandtschaftsgrad so gering sind, daß ein Zusammenführen entlang von Graten der Wertelandschaft ohne Neukombination sehr unwahrscheinlich ist, können durch homologe Neukombination der verschiedenen Unterverteilungen einer Quasi-Spezies im Sequenz- und Funktionsraum stark aufgeweitet werden. Hierdurch entsteht ein evolutives Verfahren, welches im Gegensatz zur seriellen Einführung von Mutationen zu einer Vervielfachung der experimentellen Geschwindigkeit führt. Weiterhin ermöglicht ein technisch-kontrollierter Einsatz homologer Rekombination prinzipiell auch das Verschmelzen von Quasi-Spezies-Verteilungen, die unter unterschiedlichem Selektionsdruck generiert wurden, und damit das Zusammenführen getrennt selektierter, molekularer Funktionen.

Experimentell läßt sich Rekombination unterschiedlich realisieren: Einerseits in-vitro unter Verwendung einzelner Enzymfunktionen oder definierter Mischungen bzw. Abfolgen enzymatischer Prozessierungsschritte, andererseits in-vivo unter Verwendung zellulärer Rekombinations- und/oder Reparaturprozesse.

Für in-vitro-Verfahren werden technisch bislang vorwiegend PCR-basierende Verfahren eingesetzt. Zunächst ist hier das DNA-Shuffling, auch als sexual PCR bezeichnet, zu nennen (WO 95/22625; Stemmer, Nature 370 (1994), 389). Hierbei werden beliebige aber überlappende Genfragmente vorgelegt und anschließend durch eine PCR ohne Primer-

Zugabe wieder zu Produkten der Originallänge aufgebaut. Durch gegenseitiges Primen der Fragmente können so bei jedem PCR-Zyklus Fragmente unterschiedlichen Ursprungs zufällig zu einem Produktmolekül homolog verbunden werden. Durch Einstellen der Fragmentlänge ermöglicht das DNA-Shuffling prinzipiell ein Eingrenzen der Häufigkeit von Rekombinationsereignissen. Ebenfalls PCR-basierend ist die Methode der PCR using random primers (WO 98/42728; Shao et al., Nucl. Acids Res. 26 (1998), 681). In diesem Verfahren werden Primer mit randomisierten Sequenzen verwendet, die ein Starten der Polymerisation an zufälligen Stellen innerhalb eines Polynucleotids ermöglichen. So entstehen ähnlich dem DNA-Shuffling kurze Polynucleotid-Fragmente, die durch gegenseitiges Primen miteinander rekombinieren können. Ein Steuern der Rekombinationshäufigkeit ist mit dieser Methode kaum möglich. Außerdem führen die unspezifischen Primer zu einer vergleichsweise hohen inhärenten Fehlerrate, die bei sensiblen Sequenzabschnitten und/oder langen Genen problematisch werden kann. Alternativ zu diesen Methoden verwendet der staggered extension process (WO 98/42728; Zhao et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998), 258) ein modifiziertes PCR-Protokoll um einen Strangaus-tausch während der PCR-Amplifikation zu provozieren. Durch Verwendung sehr kurzer Phasen bei der Polymerisations-temperatur zwischen den Aufschmelz- und Annealingphasen können unvollständig gebildete Produkte mit neuen Matrizen hybridisieren und weiter verlängert werden. Das Einstellen der Rekombinationshäufigkeit kann durch Vorgabe der Polymerisationszeit und der Zyklusanzahl erfolgen. Technisch limitierend ist hier das exakte Einstellen sehr kurzer Phasen einer bestimmten Temperatur. Alternativ zu diesen PCR-basierenden Verfahren ist ein Verfahren beschrieben, das aus einer Population von Polynucleotidsequenzen mit Mutationen Heteroduplices erzeugt, welche dann in-vivo durch Einfügen in Zellen oder in-vitro durch Inkubation mit einem Zellextrakt einer statistischen Reparatur unterworfen werden, wodurch je nach relativer Häufigkeit der Varianten in der Ausgangspopulation zu einem gewissen Anteil rekombinierte Molekülvarianten entstehen (WO 99/29902). Charakteristisch für dieses Verfahren ist die Verwendung von zellulären Reparatursystemen, die spezifisch ungepaarte Basen erkennen und statistisch einen der beiden Stränge im Doppelstrang reparieren. Die Limitation dieses Verfahrens liegt einerseits in der begrenzten Effizienz, Polynucleotide in Zellen einzubringen und in der fehlenden Kontrollierbarkeit der Reparaturprozesse. Weiterhin ist von entscheidendem Nachteil, daß in einem Reparaturschritt nur jeweils zwei Ausgangsmoleküle miteinander rekombiniert werden können.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Polynucleotiden mit veränderten Eigenschaften zur Verfügung zu stellen, das die oben beschriebenen Nachteile der bekannten Verfahren vermeidet und das eine effiziente Neukombination von Genotypen einer Quasi-Spezies von Polynucleotid-Molekülen erlaubt und das so zur Erzeugung veränderter Phänotypen führt.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Ansprüchen dargestellten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Erzeugung von Polynucleotidmolekülen mit veränderten Eigenschaften, wobei mindestens ein Zyklus umfassend die folgenden Schritte durchlaufen wird:

- (a) Bereitstellen einer Population einzelsträngiger Polynucleotidmoleküle, wobei die einzelnen Polynucleotidmoleküle dieser Population mindestens einen homologen Sequenzabschnitt und mindestens zwei heterologe Sequenzabschnitte besitzen und in der Population auch jeweils zu diesen Einzelsträngen vollständig oder teilweise komplementäre Stränge enthalten sind;
- (b) Herstellung doppelsträngiger Polynucleotidmoleküle aus der gemäß Schritt (a) bereitgestellten Population einzelsträngiger Polynucleotidmoleküle, umfassend Doppelstränge mit unterschiedlichen heterologen Sequenzabschnitten (Heteroduplices);
- (c) partieller exonucolytischer Einzelstrangabbau der gemäß Schritt (b) hergestellten doppelsträngigen Polynucleotidmoleküle; und
- (d) Template-gerichtete Einzelstrangsynthese ausgehend von abgebauten Enden des gemäß Schritt (c) hergestellten partiell abgebauten Doppelstranges,

wobei die Schritte (c) und (d) nacheinander oder gleichzeitig ausgeführt werden können.

Das Verfahren ist für eine der weiter unten beschriebenen möglichen Varianten schematisch in Fig. 1 dargestellt.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt eine je nach Bedarf zufällige oder aber kontrollierte Neukombination heterologer Sequenzbereiche. Durch das Prinzip des definiert-partiellen sequentiellen einzelsträngigen Polynucleotidabbaus von doppelsträngigen Heteroduplex-Polynucleotiden und des darauf folgenden semikonservativen Wiederaufbaus von einzelsträngigen Polynucleotiden läßt diese Methode neben der vollständigen auch eine regioselektive Rekombination von heterologen Sequenzbereichen zu. Zudem ist die Rekombinationshäufigkeit hoch und kann durch die Anzahl der Zyklen präzise eingestellt werden. Eine derartige Kontrolle der Rekombinationshäufigkeit kann mit den bisher beschriebenen Verfahren des DNA-Shufflings und des staggered extension process teilweise auch erreicht werden. Das random priming bietet diese Möglichkeit nicht, das Reparatur-System kaum. Der staggered extension process hat jedoch wie das random priming den Nachteil des Hintergrunds von nicht rekombinierten Ausgangspolynucleotiden, da beide Methoden auf einer Amplifikation dieser Ausgangspolynucleotide beruhen. Das DNA-Shuffling hat zwar einen reduzierten Hintergrund an Ausgangspolynucleotiden, erreicht dies jedoch durch Fragmentieren der Ausgangssequenzen, was experimentell aufwendig ist. Weiterhin bietet es wie das random priming und das Reparatur-System keine Möglichkeit einer regioselektiven Rekombination.

Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich somit durch eine Kombination von Vorteilen aus, die so mit keinem der bisher beschriebenen Verfahren erreichbar ist (vgl. Tabelle 1). Der geringe experimentelle und zeitliche Aufwand der Methode und die Möglichkeit der Automatisierung sind weitere Vorzüge.

Tabelle 1

Vergleich von verschiedenen in vitro Rekombinationsmethoden

5	Verschiedene in vitro Rekombinationsmethoden:	Vorliegende Erfindung Ausführungsform:		DNA-Shuffling	Staggered Extension	Random Priming	Repair System
	Vorteile:	A	B				
10	Hohe Rekombinationswahrscheinlichkeit	+	+	+	-	+	-
15	Kontrolle der Rekombinationshäufigkeit	+	+	+/-	+	-	+/-
	regional-vollständige Rekombination möglich	+	+	+	+	+	+/-
20	regioselektive Rekombination möglich	+	+	-	+	+/-	-
25	Rekombination der Ausgangspopulation	+	+	+	-	-	+/-
	Kein Fragmentieren der Ausgangssequenzen	+	+	-	+	+	+
30	geringer zeitlicher und experimenteller Aufwand	+	+	-	+	+	+/-
35	automatisierbar	+	+	-	+	+	+/-

Als Produkte eines einzelnen Zyklus nach dem erfindungsgemäßen Verfahren ergeben sich semikonservative, einzelsträngige Polynucleotide, da ein je nach Ausführung längerer oder kürzerer Sequenzabschnitt am 3'- oder 5'-Ende erhalten geblieben ist, während die restliche Sequenz am 3'- oder 5'-Ende neu synthetisiert wurde. Die Wahrscheinlichkeit der Herstellung von einzelsträngigen semikonservativen Polynucleotiden in einem Zyklus ist für eine der weiter unten beschriebenen Varianten des Verfahrens in Fig. 2 dargestellt. Hierbei entstehen aus Heteroduplices mit zwei heterologen Sequenzbereichen neukombinierte semikonservative einzelsträngige Polynucleotide mit einer Wahrscheinlichkeit von 50%.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird mehr als ein Zyklus umfassend die obengenannten Schritte (a) bis (d) durchlaufen, d. h. mindestens zwei, vorzugsweise mindestens 5, besonders bevorzugt mindestens 10 und ganz besonders bevorzugt mindestens 20.

Durch die zyklische Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens lassen sich so aus einer Ausgangsverteilung verwandter Polynucleotidsequenzen Polynucleotide mit mehrfach neu kombinierten Sequenzbereichen herstellen. Insbesondere erlaubt die zyklische Anwendung, mehrere verschiedene heterologe Sequenzabschnitte miteinander zu kombinieren. Weiterhin kann durch die Anzahl der Zyklen die Rekombinationshäufigkeit pro Polynucleotidstrang exakt gesteuert werden. Bei zyklischer Anwendung läßt sich so auch der mittlere Abstand zwischen Neukombinationsereignissen von einem zum nächsten Zyklus steuern.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Abbaulänge des exonucleolytischen Abbaus gemäß Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens mit zunehmender Zykluszahl stetig verkürzt. Dadurch wird die Neukombination im gesamten Sequenzbereich der gemäß Schritt (a) bereitgestellten Polynucleotide ermöglicht.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird nach einem, mehreren oder allen Zyklen des erfindungsgemäßen Verfahrens ein Selektionsschritt ausgeführt. Dieser kann sich entweder auf den Genotyp oder auf den Phänotyp oder sowohl auf den Genotyp als auch auf den Phänotyp des Polynucleotids beziehen.

Der Genotyp eines Polynucleotids ist dabei die sequentielle Abfolge von verschiedenen Monomeren in dem Polynucleotid. Der Phänotyp ist die Summe der Funktionen und Eigenschaften eines Polynucleotidmoleküls sowie der durch ein Polynucleotid codierten Transkriptions- oder Translationsprodukte.

Der Selektionsschritt kann dabei z. B. in Form von amplifikationsgekoppelter (natürlicher) Selektion, Selektion durch physikalische Separation oder Selektion durch Screening erfolgen (Koltermann und Kettling, Biophys. Chem. 66 (1997), 159; Kettling et al., Current Topics in Microbiol. and Immunol. 243 (1999), 173; Koltermann, Dissertation, TU Berlin (1998)).

Bei der gemäß Schritt (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens bereitgestellten Population aus einzelsträngigen Polynucleotidmolekülen kann es sich um jede beliebige Population einzelsträngiger Polynucleotidmoleküle handeln, die min-

destens zwei Arten von Polynucleotidmolekülen umfaßt, wobei diese mindestens einen homologen Sequenzabschnitt und mindestens zwei heterologe Sequenzabschnitte umfassen. Der Begriff "Population einzelsträngiger Polynucleotidmoleküle" bezeichnet dabei eine Menge von Polynucleotidmolekülen, wobei intermolekulare Wechselwirkungen in Form von spezifischen Basenpaarungen zwischen den Molekülen verhindert werden oder nicht bestehen. Der Begriff "Polynucleotide" (Nucleinsäuren, Oligonucleotide) umfaßt dabei sowohl DNA als auch RNA. Polynucleotide sind lineare, orientierte (5'-3'-Richtung) Heteropolymere, die einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegen können. Im Doppelstrang sind zwei Einzelstränge durch Wechselwirkungen in Form spezifischer Basenpaarung aneinander gebunden. Prinzipiell können die Polynucleotide auch DNA oder RNA mit modifizierten Monomeren sein. Generell läßt sich das Verfahren auch auf analog aufgebaute, artifizielle Polymere anwenden.

Der Begriff "Homologe Abschnitte" bezeichnet Abschnitte, die auf zwei oder mehr Polynucleotidmolekülen identisch oder komplementär sind, d. h. an der entsprechenden Position die gleiche Information aufweisen.

Der Begriff "Heterologe Abschnitte" bezeichnet Abschnitte, die auf zwei oder mehr Polynucleotidmolekülen nicht identisch bzw. nicht komplementär sind, d. h. an der entsprechenden Position eine voneinander abweichende Information aufweisen. Information eines Polynucleotidmoleküls (Genotyp) bezeichnet dabei die sequentielle Abfolge von verschiedenen Monomeren in einem Polynucleotidmolekül. Ein heterologer Sequenzbereich hat eine Länge von mindestens einem Nucleotid kann jedoch auch wesentlich länger sein. Insbesondere kann ein heterologer Sequenzbereich eine Länge von zwei Nucleotiden, oder von drei Nucleotiden, beispielsweise ein Codon, sowie vorzugsweise von mehr als 5 Nucleotiden, besonders bevorzugt von mehr als 10 Nucleotiden aufweisen. Nach oben ist der Länge eines heterologen Bereichs im Prinzip keine Grenze gesetzt. Allerdings sollte ein heterologer Bereich vorzugsweise nicht länger als 10.000 Nucleotide, besonders bevorzugt nicht länger als 5.000 Nucleotide, insbesondere nicht länger als 2.000 Nucleotide und ganz besonders bevorzugt nicht länger als 1.000 Nucleotide sein. Derartige längere Sequenzabschnitte können beispielsweise die hypervariablen Bereiche einer einen Antikörper codierenden Sequenz sein, Domänen eines Proteins, Gene in einem Gencluster, Bereiche eines Genoms etc. Vorzugsweise handelt es sich bei den heterologen Bereichen um Sequenzbereiche in denen die Polynucleotidmoleküle in einzelnen Basen voneinander abweichen. Heterologe Bereiche können jedoch auch darauf beruhen, daß in einem Polynucleotidmolekül eine Deletion, Duplikation, Insertion, Inversion, Addition oder ähnliches vorliegt oder aufgetreten ist.

Die gemäß Schritt (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens bereitgestellten einzelsträngigen Polynucleotidmoleküle weisen erfindungsgemäß mindestens einen homologen und mindestens zwei heterologe Sequenzbereiche auf. Vorzugsweise weisen sie jedoch eine Vielzahl homologer und heterologer Abschnitte auf. Der Anzahl der homologen und heterologen Abschnitte ist nach oben prinzipiell keine Grenze gesetzt.

Die heterologen Abschnitte in den einzelsträngigen Polynucleotidmolekülen werden dabei jeweils von homologen Abschnitten unterbrochen. Dabei haben die homologen Abschnitte eine Länge von vorzugsweise mindestens 5, bevorzugt von mindestens 10 und besonders bevorzugt von mindestens 20 Nucleotiden. Wie die heterologen Abschnitte können aber auch die homologen Abschnitte wesentlich länger sein und eine obere Grenze für ihre Länge gibt es im Prinzip nicht. Vorzugsweise sollten sie nicht länger als 50.000 Nucleotide, bevorzugt nicht länger als 20.000 Nucleotide, besonders bevorzugt nicht länger als 10.000 Nucleotide und ganz besonders bevorzugt nicht länger als 1.000 Nucleotide sein.

Die Population einzelsträngiger Polynucleotidmoleküle enthält auch zu den jeweiligen Einzelsträngen vollständig oder teilweise komplementäre Stränge. Komplementär heißen dabei Abschnitte auf zwei oder mehr Polynucleotid-Molekülen, die aufgrund ihrer Information zu einer auf diese Abschnitte begrenzten Doppelstrangbildung durch Wechselwirkung in Form von spezifischer Basenpaarung führen können.

Das Bereitstellen einzelsträngiger Polynucleotidmoleküle gemäß Schritt (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens kann durch dem Fachmann bekannte Verfahren erfolgen. Hierzu zählen z. B. physikalische, chemische, biochemische und biologische Verfahren. Beispielhaft aufgezählt seien dabei das Aufschmelzen von Polynucleotid-Doppelsträngen mittels Erhitzen auf Temperaturen oberhalb der Annealingtemperatur (Newton, in: PCR, Spektrum Akademischer Verlag (1994); Lazurkin, Biopolymers 9 (1970), 1253-1306), die Denaturierung von Polynucleotid-Doppelsträngen mittels Zugabe von Denaturierungsreagenzien (Harnstoff, Detergenzien, etc.), die Zugabe von Enzymen, welche aus doppelsträngigen Polynucleotiden einzelsträngige Polynucleotide machen, z. B. durch exonucleolytischen Abbau von doppelsträngiger DNA zu einzelsträngiger DNA oder durch Synthese einzelsträngiger RNA mittels einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase mit oder ohne reverser Transkriptase, die asymmetrische PCR (Newton, in: PCR, Spektrum Akademischer Verlag (1994)), bei der durch Verwendung eines Überschusses an einem der beiden Primer bevorzugt einer der beiden Produktstränge gebildet wird, die Zugabe von Proteinen oder Enzymen, welche doppelsträngige DNA-Moleküle entwinden (Gyrasen, etc.), und von weiteren Proteinen oder anderen Agenzien, die die entstehenden einzelsträngigen DNA-Moleküle stabilisieren (Single strand binding-Protein, Dendrimere, etc.) und das Einfügen der Sequenz in das Genom von Einzelstrang-Viren (M13, fd etc.) und anschließende Aufreinigung des einzelsträngigen Polynucleotid-Genoms (Trower, Methods in Mol. Biol. 58 (1996), 363-366; Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley (1987); Sambrook, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). Weitere Methoden, wie z. B. die chemische Synthese von einzelsträngigen Polynucleotidmolekülen, sind dem Fachmann geläufig.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden für das Bereitstellen einer Population einzelsträngiger Polynucleotide mit homologen und heterologen Abschnitten (Schritt (a), Fig. 1) verwandte Polynucleotid-Sequenzen aus der Mutantenverteilung einer Quasi-Spezies verwendet. Der Begriff "verwandt" betrifft dabei Polynucleotide, die untereinander sowohl homologe als auch heterologe Abschnitte aufweisen.

Als Quasi-Spezies wird dabei eine durch fehlerhafte Replikation entstehende, dynamische Population miteinander verwandter Molekülvarianten (Mutanten) bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, daß entsprechend des Quasi-Spezies-Prinzips nicht der Wildtyp (Schwerpunkt der Quasi-Spezies), sondern die gesamte Verteilung Objekt der Selektion ist. Unter veränderten Selektionsbedingungen sind vorteilhafte Varianten in einer solchen Mutantenverteilung bereits entsprechend ihrem Fitnesswert enthalten und müssen nicht erst durch anschließende, zufällige Mutationen entstehen. Bei sukzessiver Verschiebung der Selektionsparameter gleicht die evolutive Generierung dann einer implizit gelenkten Drift der Quasi-Spezies entlang von Graten der Wertelandschaft. Die Herstellung von Quasi-Spezies und die Anwendung die-

ses Prinzips für die evolutive Biotechnologie ist beschrieben in WO 92/18645.

Grundlage für die Erzeugung einer Quasi-Spezies ist eine fehlerhafte Replikation der Molekülvarianten. Bei Verwendung von Polynucleotiden erfolgt die Replikation bevorzugt mit Hilfe von Replikationsenzymen, d. h. Polymerasen, die die matrigesteuerte Synthese eines Polynucleotidmoleküls ermöglichen. Die Einführung von Fehlern, d. h. die Variation der Molekülinformation, kann durch den inhärent fehlerhaften Kopierprozess allein, aber auch durch eine gezielte Erhöhung der Ungenauigkeit der Polymerase (z. B. definiert ungleichgewichtige Zugabe der Monomere, Zugabe von Basenanaloga, fehlerhafte PCR, Polymerasen mit sehr hoher Fehlerrate), durch chemische Modifikation von Polynucleotiden nach erfolgter Synthese, durch die komplette Synthese von Polynucleotiden unter zumindest teilweisem Einsatz von Monomergemischen und/oder von Nucleotidanaloga, sowie durch eine Kombination dieser Verfahren erreicht werden. Vorzugsweise werden Mutantenverteilungen einer Quasi-Spezies eingesetzt, wobei die einzelnen Mutanten der Quasi-Spezies in ihren phänotypischen Eigenschaften einer gewünschten molekularen Funktion gegenüber dem Wildtyp bereits verbessert sind. Der Begriff "Phänotyp eines Polynucleotidmoleküls" bezeichnet die Summe der Funktionen und Eigenschaften eines Polynucleotidmoleküls sowie der durch ein Polynucleotid codierten Transkriptions- oder Translationsprodukte.

Darüber hinaus können Sequenzen unterschiedlichen Ursprungs Verwendung finden, u. a. Polynucleotid-Sequenzen einer Genfamilie aus unterschiedlichen Spezies, Polynucleotid-Sequenzen, die in-vivo (z. B. durch Viren, durch Mutatorbakterien, durch Bakterien unter UV-Bestrahlung etc.) oder in-vitro (z. B. mittels Q β -Replikase-Reaktion, fehlerhafter PCR, etc.) mit besonders hoher Fehlerrate repliziert wurden, Polynucleotid-Sequenzen, in die nach Synthese mittels chemischer Agenzien Mutationen eingeführt wurden oder die chemisch derart synthetisiert wurden, daß sie homologe und heterologe Abschnitte aufweisen, oder Polynucleotid-Sequenzen, die durch eine Kombination vorgenannter Verfahren erzeugt wurden.

Prinzipiell, kann es sich bei den Polynucleotiden, die in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden, um beliebige Polynucleotide handeln, insbesondere um DNA- oder RNA-Moleküle. Es können insbesondere in Schritt (b) des Verfahrens auch Doppelstränge erzeugt werden, die aus DNA- und RNA-Strängen bestehen (DNA/RNA-Hybride).

Die Herstellung von doppelsträngigen Heteroduplex-Polynucleotiden (Heteroduplexes) gemäß Schritt (b) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird vorzugsweise durch Hybridisierung der homologen Abschnitte der komplementären Einzelstrang-Polynucleotide erreicht (Newton, in: PCR, Spektrum Akademischer Verlag (1994)).

Der Begriff "Heteroduplexes" bezeichnet dabei Polynucleotid-Doppelstränge mit mindestens einem homologen und mindestens einem heterologen Abschnitt. Durch die Verwendung einer Population von Polynucleotid-Sequenzen mit heterologen Abschnitten entstehen Heteroduplex-Polynucleotide mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit, die den jeweiligen relativen Häufigkeiten von Sequenzvarianten entspricht. Wenn man z. B. von einer ideal durchmischten Population ausgeht, in der zwei heterologe Abschnitte in jeweils zwei verschiedenen Varianten zu gleichen Teilen vorliegen, ergibt sich statistisch bei jedem zweiten doppelsträngigen Polynucleotid ein Heteroduplex. Liegt die Anzahl von Varianten deutlich über der relativen Häufigkeit einzelner Varianten, so ergeben sich fast ausschließlich Heteroduplexes.

Die Hybridisierung komplementärer Einzelstrang-Polynucleotide zu Doppelstrang-Polynucleotiden erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden. Insbesondere kann sie z. B. erreicht werden durch Zusammengeben der Einzelstränge und Einstellung von Reaktionsbedingungen, die das Annealing komplementärer Polynucleotide fördern, wie z. B. durch Absenken der Temperatur, Einstellen eines neutralen pH-Wertes und geringer Salzkonzentration etc.

Durch den exonucleolytischen Einzelstrangabbau der Heteroduplex-Polynucleotide gemäß Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die einzelnen Polynucleotid-Moleküle, die nun Bestandteil eines Doppelstrangs sind, partiell exonucleolytisch abgebaut. Wesentlich ist dabei, daß der exonucleolytische Abbau nur partiell erfolgt. Der exonucleolytische Abbau des doppelsträngigen Polynucleotidmoleküls kann dabei in 3'-5'-Richtung oder in 5'-3'-Richtung oder sowohl in 3'-5'- als auch in 5'-3'-Richtung erfolgen. Ferner kann der Abbau von längeren ungepaarten einzelsträngigen Bereichen aus heterologen Abschnitten der Polynucleotidmoleküle exonucleolytisch durch Zugabe einzelstrangspezifischer Exonucleasen jeweils in 5'-3'- als auch in 3'-5'-Richtung erfolgen. Somit entstehen doppelsträngige Polynucleotide mit einzelsträngigen Abschnitten. Die mittlere Länge und zugehörige Verteilung des Einzelstrangabbaus in 3'-5'- oder 5'-3'-Richtung kann über die Reaktionsbedingungen und die Reaktionszeit des exonucleolytischen Abbaus gesteuert werden. Bei regioselektiven Rekombinationsereignissen ist ein möglichst gleichzeitiger Start und gleichzeitiger Stop der Abbaureaktionen gewünscht, wohingegen bei vollständiger Rekombination Start und Stop der Abbaureaktionen zeitlich verzögert erfolgen kann. Ferner kann ein statistischer Einzelstrangabbau durch den Einbau von Thiodiester anstelle von Phosphodiester bei der Synthese der einzelsträngigen Polynucleotide erreicht werden, wobei der exonucleolytische Abbau des Einzelstrangs am jeweils ersten Thiodiester abbricht.

Es ist eine Vielzahl von Exonucleasen, die einen 3'- oder 5'-exonucleolytischen Abbau erlauben, bekannt. So wurden bereits Anfang der 70'er Jahre verschiedene Exonucleasen isoliert und beschrieben (Lehmann, in: The Enzymes, Boyer (Ed), Academic Press (1971), 251-270). Gegenwärtig ist eine große Vielzahl von unterschiedlichen Exonucleasen aus verschiedensten Organismen und mit unterschiedlichen Funktionen charakterisiert (Koonin, Curr. Biol. 7 (1997), R 604-6). Generell sind Exonucleasen in eine Vielzahl von verschiedenen zellulären Prozessen involviert. Verschiedenste exonucleolytische Aktivitäten wurden in der Fachliteratur beschrieben, wie der nucleolytische Abbau von einzelsträngiger DNA oder RNA, sowohl vom 3'- zum 5'-Ende des Polynucleotids als auch in umgekehrter Richtung. Auch Einzelstränge in doppelsträngige DNA können durch Exonucleasen sowohl vom 3'- zum 5'-Ende des Polynucleotids als auch in umgekehrter Richtung abgebaut werden. Selbst ein exonucleolytischer Abbau einer doppelsträngigen DNA, also der simultane Abbau der 5'- und der 3'-Enden an einem doppelsträngigen Ende wurde beschrieben.

Einige dieser Enzyme sind bereits kommerziell erhältlich. Als Beispiel für die Klasse der exonucleolytischen Enzyme sei hier stellvertretend für eine Vielzahl von Exonucleasen die Exonuclease III (ExoIII) (E.C.3.1.11.2) genannt. ExoIII wird z. B. von den Anbietern USB, Roche Molecular Biochemicals, Stratagen, New England Biolabs kommerziell vertrieben. ExoIII aus E. coli besitzt verschiedene Aktivitäten. Das Enzym ist nicht-prozessiv und hat eine spezifische 3'-5'-exonucleolytische Aktivität an DNA-Doppelsträngen, eine DNA-3'-Phosphatase-Aktivität sowie eine endonucleolytische Aktivität an apurinischen Stellen in DNA. ExoIII baut vorzugsweise 3'-Enden in DNA-Doppelsträngen ab, wohin-

gegen überhängende 3-Enden nicht abgebaut werden. Einen Überblick über Isolierung und Charakterisierung der ExoIII geben z. B. Rogers und Weiss (Gene 11 (1980), 187–195), Rogers und Weiss (Methods Enzymol. 65 (1980), 201–211, Sambrook (loc. cit.), Henikoff (Gene 28 (1984), 351–359), Ljunquist et al. (J. Bacteriol. 126 (1976), 646–653), Vandeyar et al. (Gene 65 (1988), 129–133) und Guo und Wu (Nucl. Acids Res. 10 (1982), 2065–2084). Auch verschiedenste technische Anwendungen der ExoIII sind dem Fachmann bekannt, wie in der Herstellung von einzelsträngigen Templates für Markierungsverfahren (James und Leffak (Anal. Biochem. 141 (1984), 33–37)) und verschiedenen Sequenzierverfahren (Smith (Nucl. Acids Res. 6 (1979), 831–848), Guo und Wu (Methods Enzymol. 100 (1983), 60–96) und Hoheisel und Pohl (J. Mol. Biol. 193 (1987), 447–464)) und in der Herstellung von DNA-Fragmenten durch eingebaute α -Thiophosphatnucleotide in DNA und deren terminierten Abbau durch ExoIII für Sequenzierreaktionen (Putney et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 7350–7354) und Labeit et al. (DNA 5 (1986), 173–177)). Die Einführung von Einzelstrangbereichen in doppelsträngiger DNA und deren Behandlung mit Mutagenen (Shortle und Nahtans (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978), 2170–2174)) oder die Hybridisierung mit fehlerhaften Oligonucleotiden (Nakamaye und Eckstein (Nucl. Acids Res. 14 (1986), 9679–9698)) führt zu mutagenisierten Bereichen in spezifischen Regionen. Viele weitere technische Anwendungen der ExoIII zur Modifizierung von DNA sind in der Fachliteratur beschrieben (Masamune et al. (J. Biol. Chem. 246 (1971), 2680–2691), Luckow et al. (Nucl. Acids Res. 15 (1987), 417–429), Roberts et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979), 760–764), Sakonju et al. (Cell 19 (1980), 13–25), Peters und Baumeister (J. Bacteriol. 167 (1986), 1048–1054), Garon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975), 3039–3043), Riley und Weintraub (Cell 13 (1978), 281–293), Wu (Nature 371 (1985), 84–87), Henikoff (loc. cit.), Hoheisel und Pohl (Nucl. Acids Res. 14 (1986), 3605) und Henikoff (Nucl. Acids Res. 18 (1990), 2961–2966)). Kommerziell erhältlich sind auch die Exonucleasen DNA-Polymerase-III-Untereinheit-Epsilon aus *E. coli* mit 3'-5'-exonucleolytischer Aktivität (Krutyakov (Mol. Biol. 32 (1998), 197–199)), Lambda-Exonuclease von New England Biolabs aus dem Coliphagen Lambda mit Lambda-5'-3'-exonucleolytischer Aktivität an doppelsträngiger 5'-phosphorylierter DNA, wobei nicht-phosphorylierte 5'-Enden in Doppelsträngen sowie einzelsträngige DNA mit stark verminderter Aktivität ebenfalls abgebaut werden. Lambda-Exonuclease zeigt keine Aktivität an Nicks oder einzelsträngigen Bereichen in doppelsträngiger DNA (Little (Gene Amplification & Analysis 2 (1981), 135–145)). Baf31 Nuclease von USB, New England Biolabs und Quantum Biotechnologies wird aus dem Kulturmedium von *Alteromonas espejiana* Baf31 hergestellt. Baf31 baut doppelsträngige DNA sowohl von den 5'- als auch von den 3'-Enden ab und besitzt zusätzlich eine endonucleolytische Aktivität an einzelsträngiger DNA (Gray et al. (Nucl. Acids Res. 2 (1975), 1459–1492), Legerski et al. (Nucl. Acids Res. 5 (1978), 1445–1464), Wei et al. (J. Biol. Chem. 258 (1983), 13506–13512), Sambrook (loc. cit.), Bencen et al. (J. Biol. Chem. 259 (1984), 13584–13589), Hauser & Gray (Genetic Analysis, Techniques & Applications 8 (1991), 139–147) und Zhen et al. (Biochemistry 25 (1986), 6598–6603)). Exonuclease I (ExoI) wird von USB kommerziell vertrieben und stammt aus *E. coli*. ExoI degradiert spezifisch einzelsträngige DNA prozessiv in 3'-5'-Richtung (Brody et al. (J. Biol. Chem. 261 (1986), 7136–7143), Brody und Doherty (Biochemistry 24 (1985), 2072–2076), Phillips und Kushner (J. Biol. Chem. 262 (1987), 455–459), Prasher et al. (J. Biol. Chem. 258 (1983), 6340–6343), Prasher et al. (J. Bacteriol. 153 (1983), 903–908) und Ray et al. (J. Biol. Chem. 249 (1974), 5379–5381)). Weitere kommerziell erhältliche Exonucleasen sind Exonuclease V (EC 1.3.1.11.5) von USB aus *Micrococcus luteus* (ATCC 4698), Exonuclease VII von USB aus *E. coli*, T7-5'-Exonuclease, Gene 6 von USB aus dem Bakteriophagen T7 und die T5-5'-Exonuclease aus dem Bakteriophagen T5 (Sayers und Eckstein (J. Biol. Chem. 265 (1990), 18311–18317), Garforth et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999), 38–49) und Moyer und Rothe (J. Virol. 24 (1977), 177–193)).

Eine Vielzahl von nicht-kommerziellen aber dem Fachmann durch Standardmethoden der Biochemie und Molekularbiologie zugängliche Exonucleasen sind in der Fachliteratur beschrieben, wie beispielsweise die 3'-5'-Exonucleasen YN120 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hanekamp und Thorsness (Current Genetics 34 (1999), 438–448)), humane WNR (Kamath-Loeb et al. (J. Biol. Chem. 273 (1998), 34145–34150), Huang et al. (Nat. Genet. 20 (1998), 114–116)), p53 aus verschiedenen Organismen (Mummenbrauer et al. (Cell 85 (1996), 1089–1099), Janus et al. (Mol. Cell. Biol. 19 (1999), 2155–2168)), 3'-5'-Exonuclease aus B-Lymphozyten (Kenner und Tredup (Mol. Cell. Biol. 11 (1991), 4398–4404)), TREX1 und TREX2 aus Säugern (Mazur und Perrino (J. Biol. Chem. 274 (1999), 19655–19660)), humane Mre 11 (Paull et al. (Molecular Cell 1 (1998), 969–979)), 3'-5'-Exonuclease aus humanen Myeloblasten (Perrino et al. (J. Biol. Chem. 269 (1994), 16357–16363)), 3'-5'-Exonuclease aus dem Cytosol von humanen akut lymphoblastischer Leukämie H9 Zellen (Skalski et al. (Biochemical Pharmacology 50 (1995), 815–821)) und humanes VDJP (Zhu und Halligan (Biochem. Biophys. Res. Commun. 259 (1999), 262–270)). Auch eine Vielzahl von 5'-3'-Exonucleasen sind in der Fachliteratur beschrieben und dem Fachmann durch Standardmethoden der Biochemie und Molekularbiologie zugänglich, wie beispielsweise DNase VII aus humanen Plazenta Nuclei (Pedrini und Grossman (J. Biol. Chem. 258 (1983), 1536–1543)), 5'-3'-Exonuclease aus dem Bakteriophagen N4 (Guinta et al. (J. Biol. Chem. 261 (1986), 10736–10743)), Exonuclease V aus Zellkernen von *Saccharomyces cerevisiae* (Burgers et al. (J. Biol. Chem. 263 (1988), 8099–8105)), Exonuclease aus Kälberthymus (Siegal et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 9377–9381), Murante et al. (J. Biol. Chem. 269 (1994), 1191–1196)), 5'-3'-Exonuclease aus Zellkernextrakten (ExoI) von *Saccharomyces cerevisiae* (Huang und Symington (Mol. Cell. Biol. 13 (1993), 3125–3134; Fiorentini et al. (Mol. Cell. Biol. 17 (1997), 2764–2773)), RAD2 und RTH1 aus *Saccharomyces cerevisiae* sowie das humane XPG Homolog (Habroken et al. (J. Biol. Chem. 269 (1994), 31342–31345), Sommers et al. (J. Biol. Chem. 270 (1995), 4193–4196)), virale Polymerase-assoziierte Exonucleasen (Sayers (Methods Enzymol. 275 (1996), 227–238)), T4-RNase H aus dem Bakteriophagen T4 (Mueser et al. (Cell 85 (1996), 1101–1112)), sowie humane Werner-Syndrom-Helikase (Suzuki et al. (Nucl. Acids Res. 27 (1999), 2361–2368)). Ferner können auch die weiter unten beschriebenen exonucleolytischen Aktivitäten von Polymerasen verwendet werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt der exonucleolytische Einzelstrangabbau der doppelsträngigen Polynucleotide gemäß Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens in 3'-5'-Richtung.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform (Ausführungsform A; siehe Fig. 3, erster Zyklus) wird ein Strang des Doppelstrangs vor dem exonucleolytischen Abbau geschützt, so daß in dieser Ausführungsform nur einer der beiden

Polynucleotidstränge dem exonucleolytischen Verdau exponiert ist, während der komplementäre Strang als Matrize bei der template-gerichteten Einzelstrangsynthese gemäß Schritt (c) dient.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden beide Polynucleotidstränge dem exonucleolytischen Verdau gleichermaßen ausgesetzt (Ausführungsform B, Fig. 4, erster Zyklus), so daß beide Stränge mit einem Teil der Sequenz als Matrize dienen, während der andere Teil der Sequenz eine semikonservative Einzelstrangsynthese durchläuft.

Der exonucleolytische Abbau von einzelsträngigen Polynucleotiden in den gemäß Schritt (c) hergestellten Heteroduplex-Polynucleotiden kann nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen und ist beispielsweise beschrieben in Ross (Methods 17 (1999), 52-59); Hoheisel (Anal. Biochem. 209 (1993), 238-246) und Ausubel (Current Protocols in Molecular Biology; Wiley (1987)). Insbesondere kommen dabei chemische oder biochemische Verfahren in Frage. Vorzugsweise erfolgt ein exonucleolytischer Abbau biochemisch mittels Enzymen mit entsprechender, spezifischer Aktivität, z. B. ein 3'-exonucleolytischer Abbau durch Verwendung der Exonuclease III aus *E. coli*. Über die Reaktionsbedingungen und die Reaktionszeit für den partiellen Abbau kann die Länge des Abbaus und damit die Regioselektivität der Neukombination im entscheidenden Maß beeinflußt werden. Die Reaktion kann z. B. durch Wechsel der Pufferbedingungen, durch einen Temperaturwechsel, durch Zugabe eines Cofaktors, vorzugsweise jedoch durch Zugabe der Exonuclease gestartet und z. B. durch Wechsel der Pufferbedingungen, durch Zugabe eines Inhibitors, durch Zugabe einer Protease, durch Temperaturerniedrigung, vorzugsweise jedoch durch Temperaturerhöhung (z. B. Denaturierung der Exonuclease III bei 62°C) gestoppt werden. Die Abbaurate der Exonuclease hängt im wesentlichen von den Reaktionsbedingungen ab und kann ebenfalls über einen weiten Bereich eingestellt werden. Bei einer Abbaurate z. B. der Exonuclease III von 400 Nucleotiden pro Minute unter Standardreaktionsbedingungen kann der Bereich durch Wahl der Inkubationszeit z. B. mit einer Genauigkeit im Bereich von 20-30 nt eingestellt werden. Die Einstellung der verschiedenen Bedingungen, um den exonucleolytischen Abbau zu steuern, gehört zum allgemeinen Fachwissen des Fachmanns.

Alternativ kann die 3'-5'-exonucleolytische Aktivität auch durch die in Schritt (d) verwendete Polymerase bereitgestellt werden, insofern diese über eine entsprechende Exonuclease-Funktion verfügt.

Für die in Fig. 3 dargestellte Ausführungsform A, bei der ein Strang vor dem 3'-exonucleolytischen Abbau geschützt wird, können die 3'-Enden auf verschiedene Arten gegen einen exonucleolytischen Abbau geschützt werden, beispielsweise durch das Einführen eines Thioesters anstelle eines Phosphodiesters am 3'-Ende des Phospho-Ribose-Rückgrates. Dabei kann bei beidseitiger Thioester-Modifikation durch vorheriges Einfügen einer singulären Restriktionsschnittstelle in die Sequenz und anschließendes Schneiden mit dem Restriktionsenzym einer der beiden Stränge selektiv geschützt werden (Ausführungsform A-1). Ferner kann ein Strang durch das Vorlegen eines der beiden Stränge als zirkulärer Einzelstrang (z. B. durch Verwendung von viralem Einzelstrang-Genom, Ausführungsform A-2) oder durch Erzeugen eines einzelsträngigen 3'-Überhang von mehr als 4 Basen (u. a. möglich bei Verwendung Exonuclease III, Ausführungsform A-3) geschützt werden. Außerdem können die beiden Enden auf einer Seite des Doppelstrangs durch Anfügen eines zirkulären Einzelstrangs per Ligase kovalent miteinander verknüpft werden (Ausführungsform A-4).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden ungepaarte Teilbereiche der Heteroduplices im Schritt (c) mittels einer einzelstrangspezifischen Exonuclease exonucleolytisch abgebaut, z. B. in 3'-5'-Richtung durch Exonuclease I aus *E. coli*.

In einer anderen Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt der exonucleolytische Einzelstrangabbau der doppelsträngigen Polynucleotidmoleküle gemäß Schritt (c) in 5'-3'-Richtung. Vorzugsweise wird dabei die T7-Exonuclease Gen 6 aus dem Bakteriophagen T7 verwendet.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden ferner ungepaarte Teilbereiche der Heteroduplices exonucleolytisch abgebaut in 5'-3'-Richtung, z. B. mittels der Exonuclease VII aus *E. coli*. Ferner wird vorzugsweise ein 5'-Ende des Polynucleotid-Doppelstranges derart modifiziert, daß es vor dem 5'-exonucleolytischen Einzelstrangabbau geschützt ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt vor dem exonucleolytischen Einzelstrangabbau gemäß Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens ein Einfügen von Einzelstrangbrüchen in die doppelsträngigen Polynucleotidmoleküle (Ausführungsform C, Fig. 5, Erster Zyklus). Dabei erfolgt vorzugsweise im Mittel ein oder weniger als ein Einzelstrangbruch pro doppelsträngigem Polynucleotidmolekül.

Dabei können die Einzelstrangbrüche z. B. durch sequenzspezifische Nicking-Enzyme eingefügt werden. Beispiele hierfür sind die Nicking-Enzyme V. BclI aus *Bacillus chitinosporus*, N. BstNBI aus *Bacillus stearothermophilus*, N. BstSEI aus *Bacillus stearothermophilus*, N. CviPII aus *Chlorella strain NC64A*, N. CviQXI aus *Chlorella strain NC64A*, V. EcoDcm aus *E. coli*, V. HpaII aus *Haemophilus parainfluenzae*, V. Neal aus *Nocardia aerocolonigenes* und V. XorII aus *Xanthomonas oryzae*.

Alternativ können die Einzelstrangbrüche in die doppelsträngigen Polynucleotidmoleküle auch durch sequenzunspezifische Nicking-Enzyme eingefügt werden. Möglich ist dabei z. B. die Verwendung von DNase I aus Kälberpankreas mit Mg^{2+} als Cofactor (Kunitz, J. Genetic Physiology 33 (1950), 349; Kunitz, J. Genetic Physiology 33 (1950), 363, und Melgac und Goldthwaite, J. Biolog. Chem. 243 (1968), 4409).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt in dem Fall des Einfügens von Einzelstrangbrüchen anschließend ein exonucleolytischer Einzelstrangabbau gemäß Schritt (c) des Verfahrens in 5'-3'-Richtung, beginnend an den Einzelstrangbrüchen. Dafür kann wiederum z. B. die T7-Exonuclease Gen 6 aus dem Bakteriophagen T7 verwendet werden.

Vorzugsweise werden weiterhin ungepaarte Teilbereiche der Heteroduplices exonucleolytisch durch Exonuclease VII aus *E. coli* abgebaut.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt in dem Fall des Einfügens von Einzelstrangbrüchen anschließend ein exonucleolytischer Einzelstrangabbau gemäß Schritt (c) des Verfahrens in 3'-5'-Richtung beginnend an den Einzelstrangbrüchen. Hierfür wird vorzugsweise die Exonuclease III aus *E. coli* verwendet.

Vorzugsweise werden weiterhin ungepaarte Teilbereiche der Heteroduplices exonucleolytisch in 3'-5'-Richtung, z. B. durch Exonuclease I aus *E. coli* abgebaut.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt in dem Fall des Einfügens

Polynucleotidstränge dem exonucleolytischen Verdau exponiert ist, während der komplementäre Strang als Matrize bei der template-gerichteten Einzelstrangsynthese gemäß Schritt (c) dient.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden beide Polynucleotidstränge dem exonucleolytischen Verdau gleichermaßen ausgesetzt (Ausführungsform B, Fig. 4, erster Zyklus), so daß beide Stränge mit einem Teil der Sequenz als Matrize dienen, während der andere Teil der Sequenz eine semikonservative Einzelstrangsynthese durchläuft.

Der exonucleolytische Abbau von einzelsträngigen Polynucleotiden in den gemäß Schritt (c) hergestellten Heteroduplex-Polynucleotiden kann nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen und ist beispielsweise beschrieben in Ross (Methods 17 (1999), 52-59); Hoheisel (Anal. Biochem. 209 (1993), 238-246) und Ausubel (Current Protocols in Molecular Biology; Wiley (1987)). Insbesondere kommen dabei chemische oder biochemische Verfahren in Frage. Vorzugsweise erfolgt ein exonucleolytischer Abbau biochemisch mittels Enzymen mit entsprechender, spezifischer Aktivität, z. B. ein 3'-exonucleolytischer Abbau durch Verwendung der Exonuclease III aus *E. coli*. Über die Reaktionsbedingungen und die Reaktionszeit für den partiellen Abbau kann die Länge des Abbaus und damit die Regioselektivität der Neukombination im entscheidenden Maß beeinflußt werden. Die Reaktion kann z. B. durch Wechsel der Pufferbedingungen, durch einen Temperaturwechsel, durch Zugabe eines Cofaktors, vorzugsweise jedoch durch Zugabe der Exonuclease gestartet und z. B. durch Wechsel der Pufferbedingungen, durch Zugabe eines Inhibitors, durch Zugabe einer Protease, durch Temperaturniedrigung, vorzugsweise jedoch durch Temperaturerhöhung (z. B. Denaturierung der Exonuclease III bei 62°C) gestoppt werden. Die Abbaurate der Exonuclease hängt im wesentlichen von den Reaktionsbedingungen ab und kann ebenfalls über einen weiten Bereich eingestellt werden. Bei einer Abbaurate z. B. der Exonuclease III von 400 Nucleotiden pro Minute unter Standardreaktionsbedingungen kann der Bereich durch Wahl der Inkubationszeit z. B. mit einer Genauigkeit im Bereich von 20-30 nt eingestellt werden. Die Einstellung der verschiedenen Bedingungen, um den exonucleolytischen Abbau zu steuern, gehört zum allgemeinen Fachwissen des Fachmanns.

Alternativ kann die 3'-5'-exonucleolytische Aktivität auch durch die in Schritt (d) verwendete Polymerase bereitgestellt werden, insofern diese über eine entsprechende Exonuclease-Funktion verfügt.

Für die in Fig. 3 dargestellte Ausführungsform A, bei der ein Strang vor dem 3'-exonucleolytischen Abbau geschützt wird, können die 3'-Enden auf verschiedene Arten gegen einen exonucleolytischen Abbau geschützt werden, beispielsweise durch das Einführen eines Thioesters anstelle eines Phosphodiesters am 3'-Ende des Phospho-Ribose-Rückgrates. Dabei kann bei beidseitiger Thioester-Modifikation durch vorheriges Einfügen einer singulären Restriktionsschnittstelle in die Sequenz und anschließendes Schneiden mit dem Restriktionsenzym einer der beiden Stränge selektiv geschützt werden (Ausführungsform A-1). Ferner kann ein Strang durch das Vorlegen eines der beiden Stränge als zirkulärer Einzelstrang (z. B. durch Verwendung von viralem Einzelstrang-Genom, Ausführungsform A-2) oder durch Erzeugen eines einzelsträngigen 3'-Überhang von mehr als 4 Basen (u. a. möglich bei Verwendung Exonuclease III, Ausführungsform A-3) geschützt werden. Außerdem können die beiden Enden auf einer Seite des Doppelstrangs durch Anfügen eines zirkulären Einzelstrangs per Ligase kovalent miteinander verknüpft werden (Ausführungsform A-4).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden ungepaarte Teilbereiche der Heteroduplices im Schritt (c) mittels einer einzelstrangspezifischen Exonuclease exonucleolytisch abgebaut, z. B. in 3'-5'-Richtung durch Exonuclease I aus *E. coli*.

In einer anderen Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt der exonucleolytische Einzelstrangabbau der doppelsträngigen Polynucleotidmoleküle gemäß Schritt (c) in 5'-3'-Richtung. Vorzugsweise wird dabei die T7-Exonuclease Gen 6 aus dem Bakteriophagen T7 verwendet.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden ferner ungepaarte Teilbereiche der Heteroduplices exonucleolytisch abgebaut in 5'-3'-Richtung, z. B. mittels der Exonuclease VII aus *E. coli*. Ferner wird vorzugsweise ein 5'-Ende des Polynucleotid-Doppelstranges derart modifiziert, daß es vor dem 5'-exonucleolytischen Einzelstrangabbau geschützt ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt vor dem exonucleolytischen Einzelstrangabbau gemäß Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens ein Einfügen von Einzelstrangbrüchen in die doppelsträngigen Polynucleotidmoleküle (Ausführungsform C, Fig. 5, Erster Zyklus). Dabei erfolgt vorzugsweise im Mittel ein oder weniger als ein Einzelstrangbruch pro doppelsträngigem Polynucleotidmolekül.

Dabei können die Einzelstrangbrüche z. B. durch sequenzspezifische Nicking-Enzyme eingefügt werden. Beispiele hierfür sind die Nicking-Enzyme V. BclI aus *Bacillus chitinophilus*, N. BstNBI aus *Bacillus stearothermophilus*, N. BstSEI aus *Bacillus stearothermophilus*, N. CviPII aus *Chlorella strain NC64A*, N. CviQXI aus *Chlorella strain NC64A*, V. EcoDcm aus *E. coli*, V. HpaII aus *Haemophilus parainfluenzae*, V. Neal aus *Nocardia aerocolonigenes* und V. XorII aus *Xanthomonas oryzae*.

Alternativ können die Einzelstrangbrüche in die doppelsträngigen Polynucleotidmoleküle auch durch sequenzspezifische Nicking-Enzyme eingefügt werden. Möglich ist dabei z. B. die Verwendung von DNase I aus Kälberpankreas mit Mg^{2+} als Cofactor (Kunitz, J. Genetic Physiology 33 (1950), 349; Kunitz, J. Genetic Physiology 33 (1950), 363, und Melgac und Goldthwaite, J. Biol. Chem. 243 (1968), 4409).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt in dem Fall des Einfügens von Einzelstrangbrüchen anschließend ein exonucleolytischer Einzelstrangabbau gemäß Schritt (c) des Verfahrens in 5'-3'-Richtung, beginnend an den Einzelstrangbrüchen. Dafür kann wiederum z. B. die T7-Exonuclease Gen 6 aus dem Bakteriophagen T7 verwendet werden.

Vorzugsweise werden weiterhin ungepaarte Teilbereiche der Heteroduplices exonucleolytisch durch Exonuclease VII aus *E. coli* abgebaut.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt in dem Fall des Einfügens von Einzelstrangbrüchen anschließend ein exonucleolytischer Einzelstrangabbau gemäß Schritt (c) des Verfahrens in 3'-5'-Richtung beginnend an den Einzelstrangbrüchen. Hierfür wird vorzugsweise die Exonuclease III aus *E. coli* verwendet.

Vorzugsweise werden weiterhin ungepaarte Teilbereiche der Heteroduplices exonucleolytisch in 3'-5'-Richtung, z. B. durch Exonuclease I aus *E. coli* abgebaut.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt in dem Fall des Einfügens

von Einzelstrangbrüchen anschließend ein exonucleolytischer Einzelstrangabbau gemäß Schritt (c) sowohl in 5'-3'- als auch in 3'-5'-Richtung beginnend an den Einzelstrangbrüchen. Hierfür können die bereits oben genannten Enzyme verwendet werden. Vorzugsweise wird die Bal31-Nuclease aus dem Kulturmedium von *Alteromonas espejana* Bal31 verwendet. Ferner werden vorzugsweise ungepaarte Teilbereiche der Heteroduplices exonucleolytisch durch Exonuclease VII aus *E. coli* abgebaut.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird für den 5'-exonucleolytischen Abbau gemäß Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens, insbesondere nach Einfügung von Einzelstrangbrüchen, eine Polymerase mit 5'-exonucleolytischer Aktivität verwendet.

Die semikonservative Synthese der Polynucleotide gemäß Schritt (d) des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt schließlich durch erneute Verlängerung des 3'- bzw. 5'-Endes des partiell abgebauten Einzelstrangs mit Hilfe einer Polymerase und dem entsprechenden 5'- bzw. 3'-Abschnitt des Gegenstrangs des Heteroduplex als Template. Der Begriff "semikonservative Einzelstrangsynthese" bezeichnet dabei die Synthese eines Polynucleotids durch Verlängerung eines existierenden Einzelstrangs anhand der Information eines entsprechenden Matrizenstrangs.

Je nach Ausführung wird nur einer der beiden Stränge (z. B. codogener oder nichtcodogener Strang) verlängert (Ausführungsform A) oder beide Stränge dienen mit dem 5'-bzw. 3'-Ende als Template und werden gleichzeitig am 3'- bzw. 5'-Ende neu synthetisiert (Ausführungsform B). Bei der Ausführungsform B kann sich nach der semikonservativen Synthese der Polynucleotide eine einmalige Synthese der komplementären Polynucleotide anschließen. Hierdurch erreicht man eine effiziente Neukombination des nicht abgebauten konservativen Sequenzbereichs (siehe Fig. 4). Die Durchführung der template-gerichteten Polymerisierung ist dem Fachmann geläufig und ist z. B. beschrieben in Sambrook (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) oder Ausubel (loc. cit.).

Für die Polymerasereaktion kann ein beliebiges Enzym mit matrizengesteuerter Polynucleotid-Polymerisations-Aktivität eingesetzt werden, das in der Lage ist Polynucleotidstränge ausgehend vom 3'- oder 5'-Ende aus zu polymerisieren. Eine Vielzahl an Polymerasen aus verschiedensten Organismen und mit unterschiedlichen Funktionen wurden bereits isoliert und beschrieben. In Bezug auf die Art von Matrize und synthetisiertem Polynucleotid werden DNA-abhängige DNA-Polymerasen, RNA-abhängige DNA-Polymerasen (Reverse Transkriptasen), DNA-abhängige RNA-Polymerasen und RNA-abhängige RNA-Polymerasen (Replikasen) unterschieden. In Bezug auf die Temperaturstabilität werden nicht thermostabile (37°C) und thermostabile Polymerasen (75–95°C) unterschieden. Weiterhin unterscheiden sich Polymerasen in Bezug auf das Vorhandensein von 5'-3'- und 3'-5'-exonucleolytischer Aktivität. DNA-abhängige DNA-Polymerasen stellen die wichtigsten Polymerasen dar.

Verwendet werden können insbesondere DNA-Polymerasen mit einem Temperaturoptimum bei oder um 37°C. Hierzu gehören beispielsweise die DNA-Polymerase I aus *E. coli*, T7-DNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 und die T4-DNA-Polymerase des Bakteriophagen T4, die jeweils von einer Vielzahl von Herstellern, z. B. USB, Roche Molecular Biochemicals, Stratagene, NEB oder Quantum Biotechnologies, kommerziell vertrieben werden. Die DNA-Polymerase I aus *E. coli* (Holoenzym) besitzt eine 5'-3'-Polymerase-Aktivität, eine 3'-5'-Proofreading-Exonuclease-Aktivität und eine 5'-3'-Exonuclease-Aktivität. Das Enzym wird für in-vitro-Labeling von DNA mittels der Nick-Translation-Methode eingesetzt (Rigby et al. (J. Mol. Biol. 113 (1977), 237–251)). Im Gegensatz zum Holoenzym besitzt das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* wie die T7-DNA-Polymerase und die T4-DNA-Polymerase keine 5'-Exonuclease-Aktivität. Diese Enzyme werden daher für sogenannte Auffüllreaktionen oder für die Synthese langer Stränge eingesetzt (Young et al. (Biochemistry 31 (1992), 8675–8690), Lehman (Methods Enzymol. 29 (1974), 46–53)). Der 3'-5'-exo(-)-Variante des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I aus *E. coli* fehlt schließlich auch die 3'-Exonuclease-Aktivität. Dies Enzym wird oft für die DNA-Sequenzierung nach Sanger eingesetzt (Sanger (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463–5467)). Neben diesen Enzymen existieren noch eine Vielzahl weiterer 37°C-DNA-Polymerasen mit unterschiedlichen Eigenschaften, die in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden können.

Die am weitesten verbreitete, thermostabile DNA-Polymerase mit einem Temperaturoptimum bei 75°C und ausreichender Stabilität bei 95°C ist die Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die kommerziell erhältlich ist. Die Taq-DNA-Polymerase ist eine hoch-prozessive 5'-3'-DNA-Polymerase ohne 3'-5'-Exonuclease-Aktivität. Sie wird oft für Standard-PCRs, für Sequenzier-Reaktionen sowie für mutagene PCRs verwendet (Cadwell und Joyce (PCR Methods Appl. 3 (1994), 136–140, Arigoni und Kaminski (Methods Mol. Biol. 23 (1993), 109–114)). Ähnliche Eigenschaften weisen die Tth-DNA-Polymerase aus *Thermus thermophilus* HB8 und die Tfi-DNA-Polymerase aus *Thermus flavus* auf. Die Tth-DNA-Polymerase weist jedoch zusätzlich noch eine intrinsische Reverse-Transkriptase-(RT)-Aktivität in Gegenwart von Mangan-Ionen auf (Cusi et al. (Biotechniques 17 (1994), 1034–1036)). Unter den thermostabilen DNA-Polymerasen ohne 5'- jedoch mit 3'-Exonuclease-Aktivität werden wiederum eine ganze Reihe kommerziell vertrieben: Pwo-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei*, Tli-, Vent- bzw. DeepVent-DNA-Polymerase aus *Thermococcus litoralis*, Pfx- bzw. Pfu-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*, Tub-DNA-Polymerase aus *Thermus ubiquitous*, Tma- bzw. UITma-DNA-Polymerase aus *Thermotoga maritima* (Newton und Graham, in: PCR, Spektrum Akad. Verlag Heidelberg (1994), 1)). Polymerasen ohne 3'-proofreading-Exonuclease-Aktivität werden eingesetzt, um möglichst fehlerfrei PCR-Produkte zu amplifizieren. Schließlich sind mit dem Stoffel-Fragment der Taq-DNA-Polymerase, mit der Vent-(exo-)-DNA-Polymerase, sowie der Tsp-DNA-Polymerase thermostabile DNA-Polymerasen ohne 5'- und ohne 3'-exonucleolytischer Aktivität verfügbar.

Unter den RNA-abhängigen DNA-Polymerasen (Reverse Transkriptasen) gehören die AMV-Reverse Transkriptase aus dem Avian Myeloblastosis Virus, die M-MuLV-Reverse Transkriptase aus Moloney Murine Leukemia Virus, und die HIV-Reverse Transkriptase aus dem Human Immunodeficiency Virus zu den gebräuchlichsten Enzymen, welche auch von diversen Anbietern wie z. B. NEB, Life Technologies, Quantum Biotechnologies kommerziell vertrieben werden. Die AMV-Reverse Transkriptase besitzt wie die HIV-Reverse Transkriptase eine assoziierte RNase-H-Aktivität. Diese ist bei der M-MuLV-Reverse Transkriptase deutlich reduziert. Sowohl der M-MuLV als auch der AMV-Reversen Transkriptase fehlt eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität.

Unter den DNA-abhängigen RNA-Polymerasen gehören die RNA-Polymerase aus *E. coli*, die SP6-RNA-Polymerase aus *Salmonella typhimurium* LT2, infiziert mit dem Bakteriophagen SP6, die T3-RNA-Polymerase aus dem Bakterio-

phage T3, und die T7-RNA-Polymerase aus dem Bakteriophage T7 zu den gebräuchlichsten Enzymen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die Matrizenstränge in Schritt (d) des Verfahrens DNA-Moleküle, und es wird für die template-gerichtete Einzelstrangsynthese eine DNA-abhängige DNA-Polymerase verwendet.

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird dabei eine nicht thermostabile DNA-Polymerase verwendet, besonders bevorzugt eine solche mit 5'- und 3'-exonucleolytischer Aktivität, wie z. B. Polymerase I aus *E. coli*.

Alternativ kann auch eine nicht thermostabile DNA-Polymerase verwendet werden, die keine 5'-exonucleolytische Aktivität, aber eine 3'-exonucleolytische Aktivität besitzt, wie z. B. das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*, die T7-DNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 oder die T4-DNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T4.

- 10 Ferner kann auch eine nicht thermostabile DNA-Polymerase verwendet werden, die weder 5'- noch 3'-exonucleolytische Aktivität aufweist, wie z. B. die 3'-5'-exo(-)-Variante des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I aus *E. coli*.

- In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform wird eine thermostabile Polymerase (z. B. Taq-Pol, Pwo-Pol, etc.) eingesetzt. Diese kann dabei wiederum 5'- und 3'-exonucleolytische Aktivität aufweisen oder aber 5'-exonucleolytische Aktivität, aber keine 3'-exonucleolytische Aktivität wie z. B. die Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die Tth-DNA-Polymerase aus *Thermus thermophilus* HB8 oder die Tfi-DNA-Polymerase aus *Thermus flavus*.

- Alternativ kann die thermostabile DNA-Polymerase keine 5'- aber 3'-exonucleolytische Aktivität aufweisen, wie z. B. die Pwo-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei*, die VentR-DNA-Polymerase, die DeepVentR-DNA-Polymerase bzw. die Tli-DNA-Polymerase aus *Thermococcus litoralis*, die Pfu-DNA-Polymerase bzw. die Pfx-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* oder Tma-DNA-Polymerase bzw. Uti'ma-DNA-Polymerase aus *Thermotoga maritima*.

Ferner kann eine thermostabile Polymerase verwendet werden, die weder 3'- noch 5'-exonucleolytische Aktivität aufweist, wie z. B. das Stoffel-Fragment der Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die Tsp-DNA-Polymerase oder die exo(-)-Variante der VentR-DNA-Polymerase bzw. DeepVentR-DNA-Polymerase aus *Thermococcus litoralis*.

- Im Fall der Verwendung einer thermostabilen Polymerase schließt sich die Polymerasereaktion vorzugsweise direkt an den z. B. durch Temperaturerhöhung gestoppten exonucleolytischen Abbau ohne zwischenzeitliche Aufreinigung oder weitere Probenbehandlung an. Weiterhin wird vorzugsweise die erneute Zugabe von Polymerase bei mehreren Zyklen nach jeder Ausführungsrunde vermieden. Bei Verwendung einer Exonuclease, die bei Aufheizen auf eine Temperatur $\leq 72^\circ\text{C}$ denaturiert, nach thermischem Aufschmelzen der Stränge bei ca. 90°C und erneutem Abkühlen unter die Annealing-Temperatur jedoch renaturiert wird, ist so eine Ausführungsform möglich, die als Eintopf-Reaktion über viele Zyklen ohne zwischenzeitliche Zugabe von Substanzen oder Probenmanipulation arbeitet. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird Exonuclease relativ zur Polymerase im Überschuß zugesetzt, wobei die Prozessivität der Polymerase (Pol I, etc.) deutlich höher ist als die Prozessivität des exonucleolytischen Abbaus.

- In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden im Fall des Einfügens von Einzelstrangbrüchen vor dem exonucleolytischen Abbau und der anschließenden template-gerichteten Einzelstrangsynthese die 3'-Enden der neu synthetisierten Abschnitte kovalent verknüpft. Vorzugsweise erfolgt diese Verknüpfung mittels einer Ligase, besonders bevorzugt mit der T4-DNA-Ligase aus dem Bakteriophagen T4.

- In einer anderen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die Matrizenstränge in Schritt (d) des erfindungsgemäßen Verfahrens, an denen die template-gerichtete Einzelstrangsynthese erfolgt, RNA-Moleküle. In diesem Fall wird für die template-gerichtete Einzelstrangsynthese eine RNA-abhängige DNA-Polymerase verwendet, vorzugsweise AMV-Reverse Transkriptase aus dem Avian Myeloblastosis Virus, HIV-Reverse Transkriptase aus dem Human Immunodeficiency Virus, oder M-MuLV-Reverse Transkriptase aus dem Moloney Murine Leukemia Virus. Ferner wird bevorzugt eine thermostabile Reverse Transkriptase verwendet, ganz besonders die Tth-DNA-Polymerase aus *Thermus thermophilus* mit intrinsischer Reverser-Transkriptase-Aktivität.

- In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform besteht der Polynucleotidstrang, der gemäß Schritt (c) dem exonucleolytischen Einzelstrangabbau unterworfen ist und gemäß Schritt (d) der Einzelstrangsynthese unterliegt, aus RNA.

Schließlich wird in einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens durch Kontrolle des partiellen, exonucleolytischen Einzelstrangabbaus gemäß Schritt (c) des Verfahrens die Regioselektivität der Kombination zwischen partiell abgebauten und neu synthetisierten Strängen gesteuert.

- Die neusynthetisierten semikonservativen Einzelstrangpolynucleotide umfassen somit vom, je nachdem, 5'-Ende bis zum 3'-Ende oder vom 3'- bis zum 5'-Ende des exonucleolytischen Abbaus die ursprüngliche Information sowie vom 5'-Ende bis zum 3'-Ende oder vom 3'- bis zum 5'-Ende der Neusynthese die Information des Gegenstrangs. Die Fig. 3 und 4 zeigen beispielhaft die möglichen Ausführungsformen A und B in der zyklischen Anwendung (Variante mit 3'-exonucleolytischem Abbau). Durch die Kontrolle der Länge des exonucleolytischen Einzelstrangabbaus (z. B. zeitlich gesteuerte Reaktion der exonucleolytischen Aktivität) lassen sich in jedem Zyklus Neukombinationsereignisse regioselektiv, also bevorzugt in bestimmten Abschnitten der Polynucleotid-Sequenzen erzeugen. Durch die zyklische Anwendung dieses Verfahrens, beginnend mit der erneuten Herstellung von Heteroduplex-DNA aus den gemäß einem ersten Zyklus hergestellten semikonservativen Einzelstrangpolynucleotiden, lassen sich wiederholt Neukombinationen herstellen. Hierbei bietet die zyklische Anwendung der Ausführungsform A (siehe Fig. 3) sowohl regioselektive als auch ubiquitäre Kombinationen von unterschiedlichen heterologen Sequenzbereichen mit einer definierten Rekombinationshäufigkeit der Polynucleotide. Die zyklische Anwendung der Ausführungsform B (siehe Fig. 4) bietet die Möglichkeit der vollständigen Neukombination der heterologen Sequenzbereiche einer Quasi-Spezies schon nach wenigen Zyklen. Hierbei ist zu betonen, daß die Ausgangspopulation der Polynucleotidstränge nicht als Matrizen für neusynthetisierte Polynucleotide dienen, sondern im Sinne eines semikonservativen Mechanismus miteinander neukombiniert werden.

- Die Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens erlaubt somit die Zusammenführung von zwei oder mehr verschiedenen heterologen Sequenzabschnitten, welche auf zwei unterschiedlichen Einzelstrang-Polynucleotiden liegen, zu neuen semikonservativen Einzelstrang-Polynucleotiden. Durch die Anwendung dieses Verfahrens lassen sich semikonservative Einzelstrang-Polynucleotide mit gleichen als auch mit unterschiedlichen Verhältnissen an konservativen und neuen Sequenzbereichen herstellen, abhängig von der kontrollierten Ausführung des exonucleolytischen Ab-

baus.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Kit enthaltend Instruktionen zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält ein derartiger Kit noch mindestens eine der folgenden Komponenten:

- (i) Puffer zur Herstellung von doppelsträngigen Polynucleotidmolekülen;
- (ii) Agenz, das einen partiellen exonucleolytischen Abbau von doppelsträngigen Polynucleotidmolekülen erlaubt;
- (iii) Puffer zur Durchführung des partiellen exonucleolytischen Abbaus;
- (iv) Agenz, das die Matrizen-gesteuerte Polymerisierung eines Polynucleotidstrangs ausgehend von dem abgebauten Ende erlaubt; und
- (v) Puffer zur Durchführung der in (v) genannten Polymerisierungsreaktion.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Fig. 2 zeigt die Wahrscheinlichkeit der Herstellung von semikonservativen Polynucleotiden aus Heteroduplices nach dem erfindungsgemäßen Verfahren.

Fig. 3 zeigt das Prinzip des zyklischen Verfahrens der Ausführungsform A des erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei Template-Polynucleotide gegen den exonucleolytischen Abbau geschützt sind.

Fig. 4 zeigt das Prinzip des zyklischen Verfahrens der Ausführungsform B des erfindungsgemäßen Verfahrens, bei dem nach jedem Zyklus Gegenstränge hergestellt werden.

Fig. 5 zeigt das Prinzip des zyklischen Verfahrens der Ausführungsform C des erfindungsgemäßen Verfahrens, bei dem vor dem exonucleolytischen Abbau Einzelstrangbrüche eingefügt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung von Polynucleotidmolekülen mit veränderten Eigenschaften, wobei mindestens ein Zyklus umfassend die folgenden Schritte durchlaufen wird:

- (a) Bereitstellung einer Population einzelsträngiger Polynucleotidmoleküle, wobei die einzelnen Polynucleotide dieser Population sowohl homologe als auch heterologe Sequenzabschnitte besitzen, und in der Population auch jeweils zu diesen Einzelsträngen vollständig oder teilweise komplementäre Stränge enthalten sind;
- (b) Herstellung doppelsträngiger Polynucleotidmoleküle aus der gemäß Schritt (a) bereitgestellten Population einzelsträngiger Polynucleotidmoleküle, umfassend Doppelstränge mit unterschiedlichen heterologen Abschnitten;

- (c) partieller, exonucleolytischer Einzelstrangabbau der gemäß Schritt (b) hergestellten doppelsträngigen Polynucleotidmoleküle; und

- (d) Template-gerichtete Einzelstrangsynthese ausgehend von abgebauten Enden des gemäß Schritt (c) hergestellten, partiell abgebauten Doppelstrangs,

wobei die Schritte (c) und (d) nacheinander oder gleichzeitig ausgeführt werden können.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei mehr als ein Zyklus umfassend die Schritte (a) bis (d) durchlaufen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Abbaulänge des exonucleolytischen Abbaus gemäß Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens mit zunehmender Zykluszahl stetig verkürzt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei nach einem, mehreren oder allen Zyklen ein Selektionsschritt ausgeführt wird, und sich der Selektionsschritt entweder auf den Genotyp oder auf den Phänotyp oder sowohl auf den Genotyp als auch auf den Phänotyp des Polynucleotids bezieht.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei der Selektionsschritt in Form von amplifikationsgekoppelter Selektion, Selektion durch physikalische Separation oder Selektion durch Screening erfolgt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die gemäß Schritt (a) bereitgestellte Population einzelsträngiger Polynucleotidmoleküle Polynucleotidmoleküle aus der Mutantenverteilung einer Quasispezies sind.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der einem exonucleolytischen Einzelstrangabbau und Einzelstrangsynthese unterworfenen Polynucleotidstrang aus DNA besteht.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der exonucleolytische Einzelstrangabbau der doppelsträngigen Polynucleotide gemäß Schritt (c) in 3'-5'-Richtung erfolgt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei in Schritt (c) für den 3'-exonucleolytischen Einzelstrangabbau Exonuclease III aus *E. coli* verwendet wird.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, wobei in Schritt (c) für den 3'-exonucleolytischen Einzelstrangabbau von ungepaarten Teilbereichen der Heteroduplices Exonuclease I aus *E. coli* verwendet wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der exonucleolytische Einzelstrangabbau der doppelsträngigen Polynucleotide gemäß Schritt (c) in 5'-3'-Richtung erfolgt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei in Schritt (c) T7-Exonuclease Gen 6 aus dem Bakteriophagen T7 für den 5'-exonucleolytischen Einzelstrangabbau der doppelsträngigen Polynucleotide verwendet wird.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei in Schritt (c) für den 5'-exonucleolytischen Einzelstrangabbau von ungepaarten Teilbereichen der Heteroduplices Exonuclease VII aus *E. coli* verwendet wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei eine der beiden Seiten des Polynucleotid-Doppelstrangs derart modifiziert wird, daß es vor dem 3'- oder 5'-exonucleolytischen Einzelstrangabbau gemäß Schritt (c) geschützt ist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Modifikation durch selektives Einfügen von Thioestern erfolgt, oder durch Schneiden mit einem Restriktionsenzym, das einen 3'-Überhang erzeugt, oder durch Vorlegen eines der beiden Stränge als zirkulärer Einzelstrang, oder durch kovalente Verknüpfung mit einem kompatiblen, zirkulären Po-

lynucleotid-Molekül.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei vor dem exonucleolytischen Einzelstrangabbau gemäß Schritt (c) ein Einfügen von Einzelstrangbrüchen in die doppelsträngigen Polynucleotidmoleküle erfolgt.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei im Mittel ein oder weniger als ein Einzelstrangbruch pro doppelsträngigem Polynucleotidmolekül erfolgt.

18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, wobei Einzelstrangbrüche in die doppelsträngigen Polynucleotidmoleküle durch sequenzspezifische Nicking-Enzyme eingefügt werden.

19. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, wobei Einzelstrangbrüche in die doppelsträngigen Polynucleotidmoleküle durch sequenzunspezifische Nicking-Enzyme eingefügt werden.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei der exonucleolytische Einzelstrangabbau gemäß Schritt (c) sowohl in 5'-3'- als auch in 3'-5'-Richtung erfolgt.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei für den gleichzeitigen 5'- und 3'-exonucleolytischen Einzelstrangabbau in Schritt (c) BaI31-Nuclease aus dem Kulturmedium von *Alcaligenes eutrophus* BaI31 verwendet wird.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei der exonucleolytische Einzelstrangabbau gemäß Schritt (c) durch eine Polymerase mit 5'-exonucleolytischer Aktivität erfolgt.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 22, wobei die Matrizenstränge in Schritt (d) DNA-Moleküle sind und für die template-gerichtete Einzelstrangsynthese eine oder mehrere DNA-abhängige DNA-Polymerasen verwendet werden.

24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei Polymerase I aus *E. coli* verwendet wird.

25. Verfahren nach Anspruch 23, wobei eine oder mehrere thermostabile DNA-Polymerasen verwendet werden.

26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, Tth-DNA-Polymerase aus *Thermus thermophilus* HB8, oder Tfi-DNA-Polymerase aus *Thermus flavus* verwendet wird.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 26, wobei die 3'-Enden der neu synthetisierten Abschnitte mit den 5'-Enden der partiell exonucleolytisch abgebauten Abschnitte kovalent verknüpft werden.

28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei die kovalente Verknüpfung mittels T4-DNA-Ligase aus dem Bakteriophagen T4 erfolgt.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 22, wobei die Matrizenstränge in Schritt (d) RNA-Moleküle sind, und für die template-gerichtete Einzelstrangsynthese eine oder mehrere RNA-abhängige DNA-Polymerasen verwendet werden.

30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei AMV-Reverse Transkriptase aus dem Avian Myeloblastosis Virus, HIV-Reverse Transkriptase aus dem Human Immunodeficiency Virus, M-MuLV-Reverse Transkriptase aus dem Moloney Murine Leukemia Virus, oder Tth-DNA-Polymerase aus *Thermus thermophilus* mit intrinsischer Reverser Transkriptase-Aktivität verwendet wird.

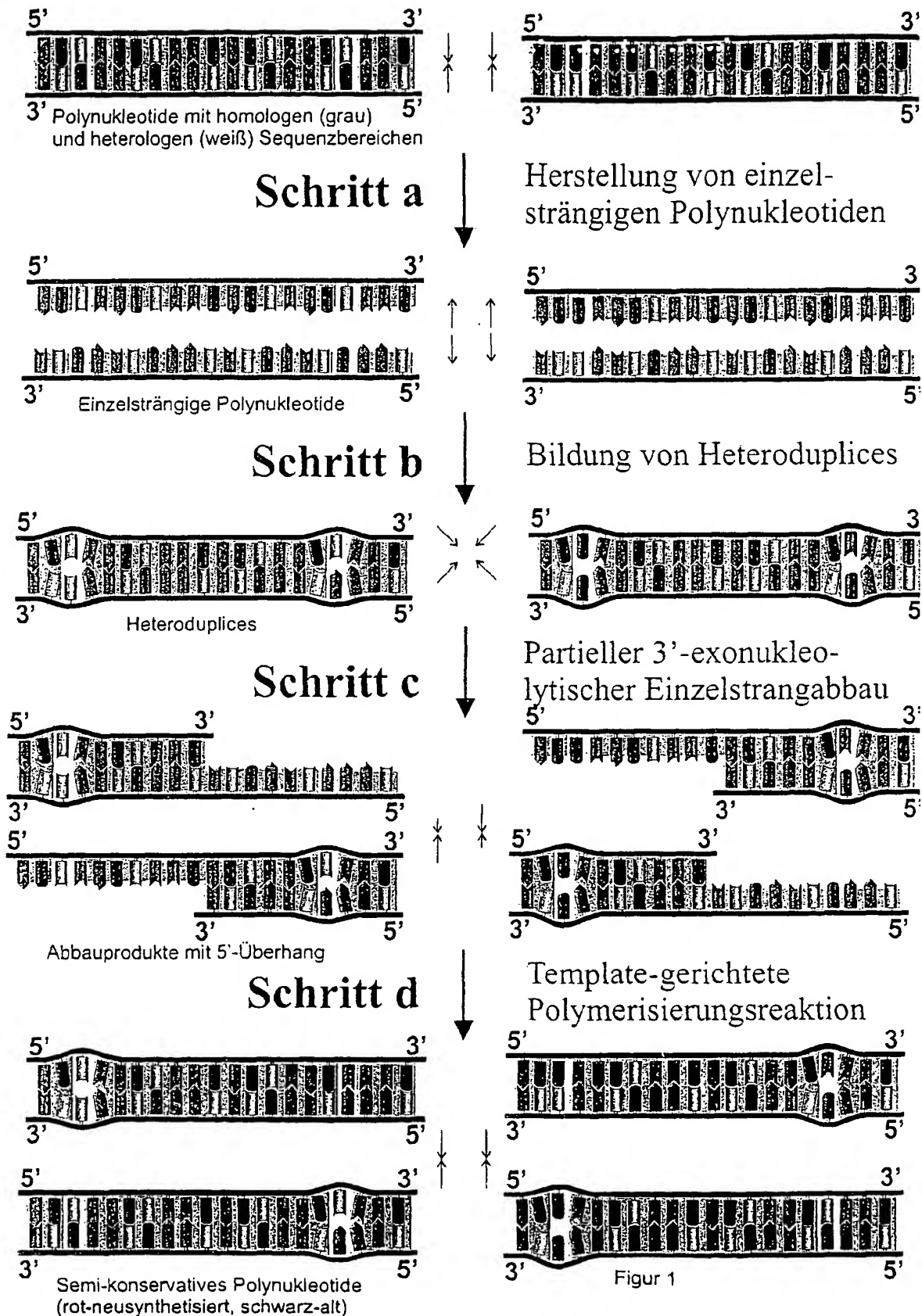
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der einem exonucleolytischen Einzelstrangabbau und Einzelstrangsynthese unterworfenen Polynucleotidstrang aus RNA besteht.

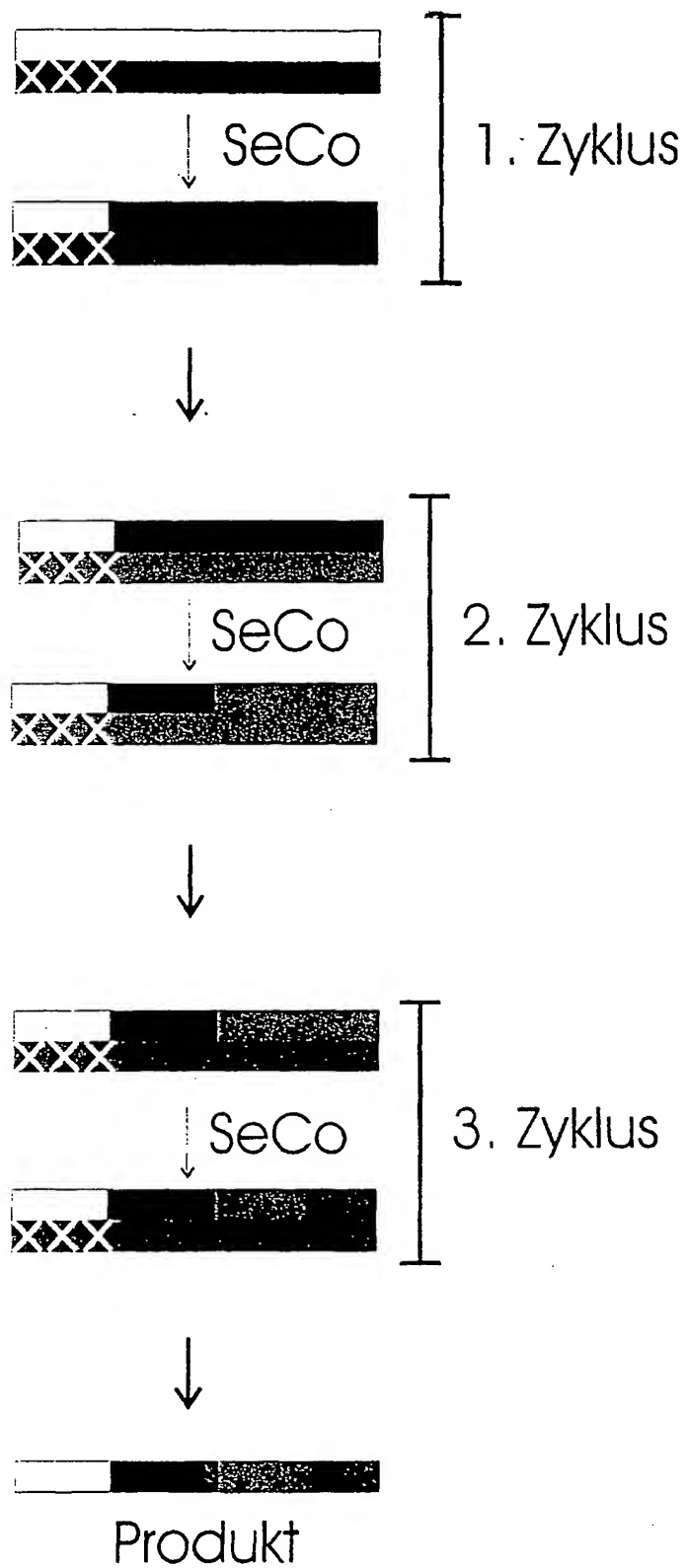
32. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 31, wobei durch Kontrolle des partiellen, exonucleolytischen Einzelstrangabbaus gemäß Schritt (c) die Regioselektivität der Kombination zwischen partiell abgebauten und neu synthetisierten Strängen gesteuert wird.

33. Kit enthaltend Komponenten und Instruktionen zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 32.

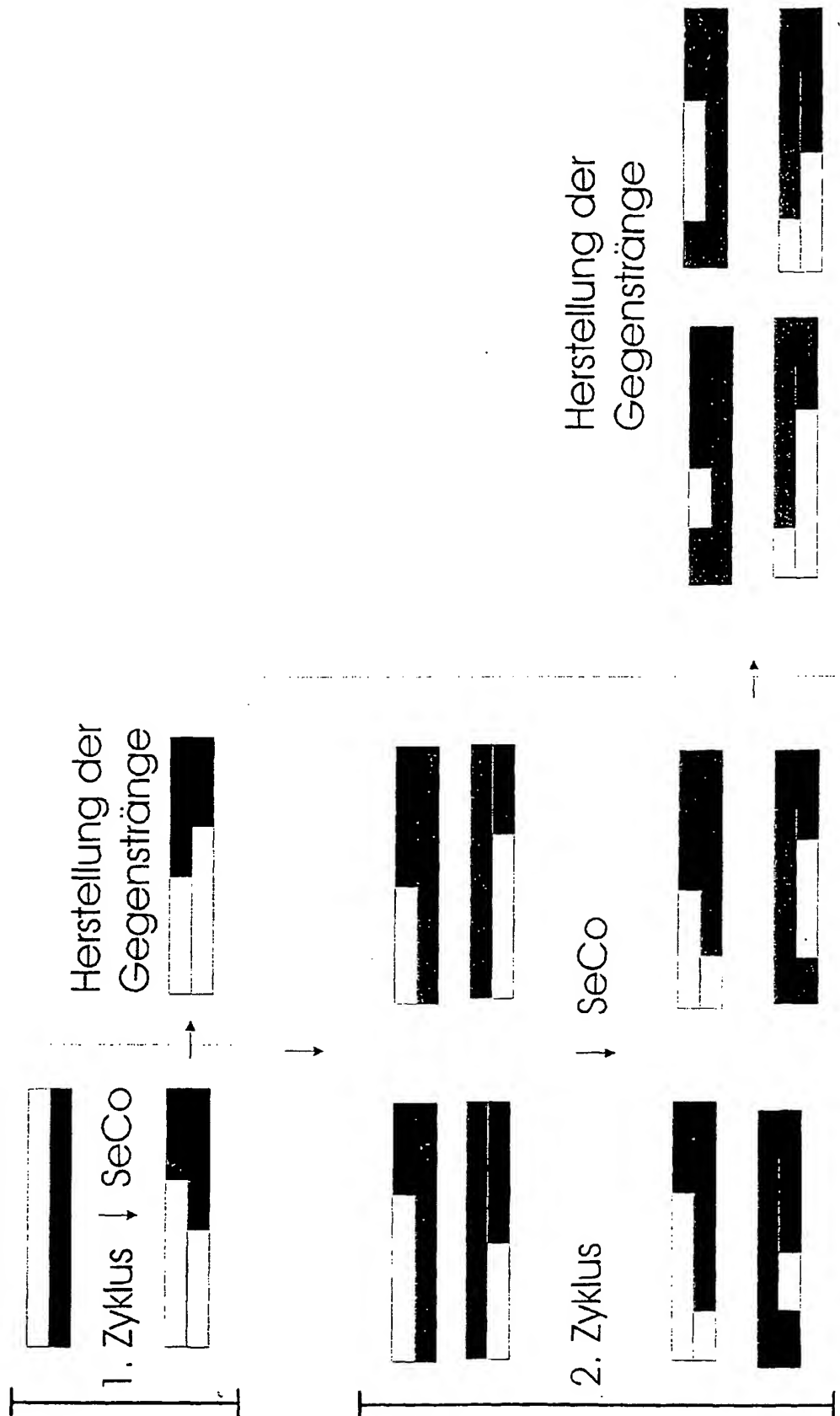
Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

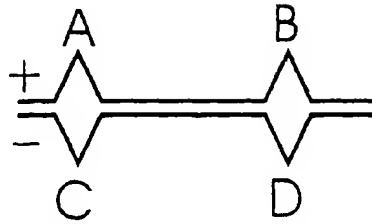




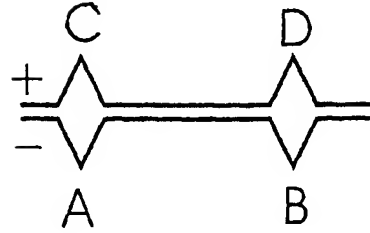
Figur 2



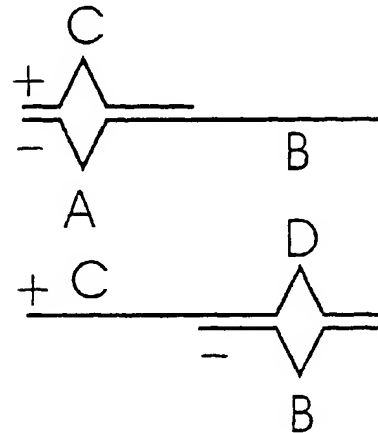
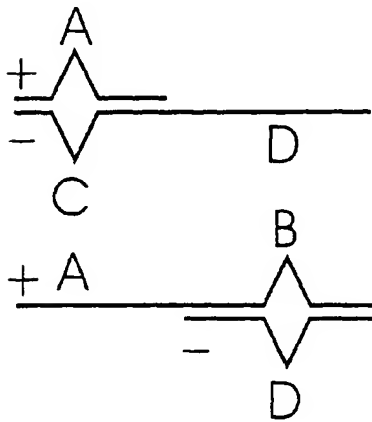
Figur 3



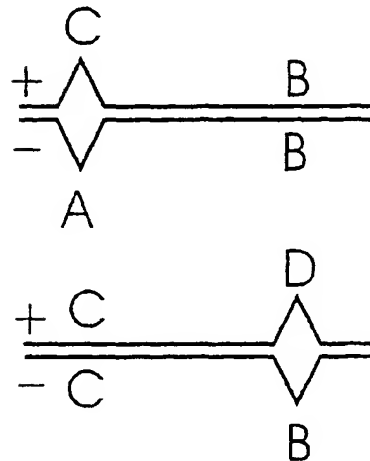
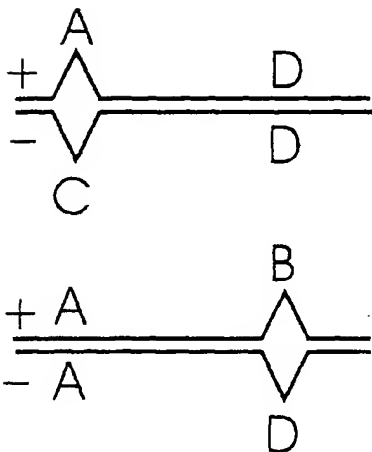
Kombinationen:
+AB 25%, -AB 25%,
+CD 25%, -CD 25%



Schritt c

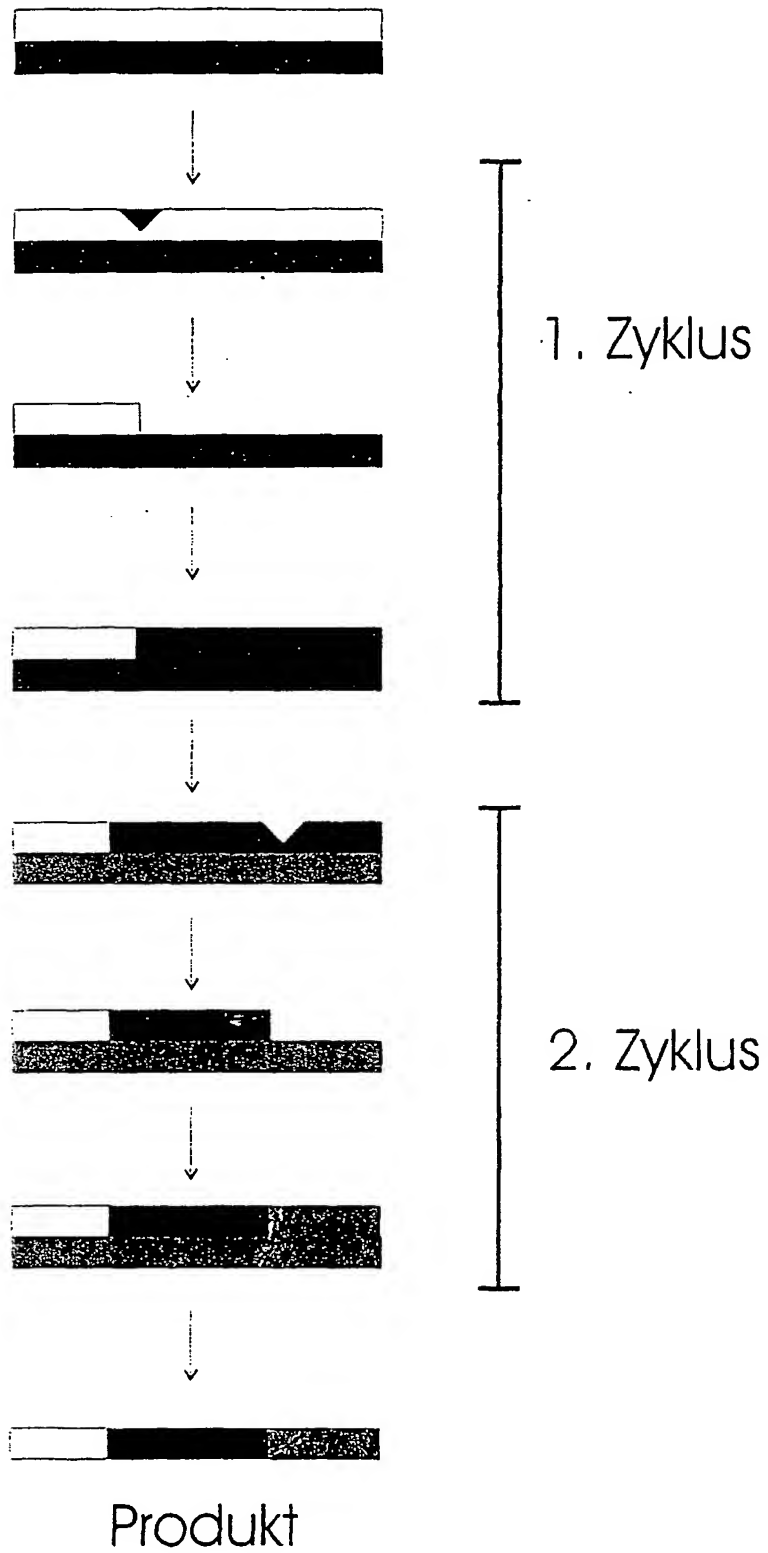


Schritt d



Kombinationen:
alt: +AB 12,5%, -AB 12,5%, +CD 12,5%, -CD 12,5%
neu: +AD 12,5%, -AD 12,5%, +CB 12,5%, -CB 12,5%

Figur 4



Figur 5